

氏名	船 山 高 明
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与番号	博甲第 1332 号
学位授与の日付	平成7年3月25日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻（学位規則第4条第1項該当）
学位論文題名	ヒト扁平上皮癌における $erbB$ 関連遺伝子およびその遺伝子産物に関する研究
論文審査委員	教授 松村智弘 教授 永井教之 教授 滝川正春

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

近年、癌遺伝子の発現が種々の癌発生のみならず、その病態にも関与することが示され、癌遺伝子や、それらの遺伝子産物の発現により腫瘍の悪性度を評価する試みが行われている。すなわち乳癌や胃癌などの腺癌症例で、 erb 関連遺伝子の増幅およびそれらの遺伝子産物の過剰発現が癌の悪性度に大きく関与することが示されている。一方、扁平上皮癌においても $c-erbB$ 遺伝子の増幅およびその遺伝子産物の過剰発現が癌の悪性度に関与するとされているが、相同性の高い $c-erbB-2$ 、 $c-erbB-3$ 遺伝子の増幅およびその遺伝子産物の過剰発現と癌の悪性度の関係についての報告はみられない。そこで本研究では $c-erbB-3$ およびalternative splicingによってコードする分泌型 $erbB-3$ を中心に扁平上皮癌における $erbB$ 関連遺伝子およびその遺伝子産物について検討した。

【材料と方法】

材料としてヒト扁平上皮癌細胞A431, SAS, Ca-9-22, KB, H0-u-1を用いた。また、非癌細胞にヒト線維芽細胞HFF, TIG-7, ヒト正常角化細胞HEKを用いた。

1) 培養細胞における $c-erbB-2$ 、 $c-erbB-3$ および分泌型 $erbB-3$ の発現
培養細胞よりDNAおよびRNAの抽出をそれぞれStaufferらおよびChomczynskiらの方法で、また膜画分の抽出をThomらの方法で行った。そして等量のDNA量を用い、 $c-erbB-2$ および $c-erbB-3$ 遺伝子部分を増幅するようにPCRを実施しgenomic DNAにおける $c-erbB-2$ 、 $c-erbB-3$ 遺伝子の増幅度の定量的解析を行った。また、等量のRNA量を用い、 $c-erbB-2$ プライマーと膜型および分泌型のみをそれぞれ認識する $erbB-3$ プライマーをもちいてRT-PCRを実施し、それぞれのmRNAの発現について定量的解析を行った。このとき標準として β アクチンを使用した。また反応の飽和していないサイクル数でPCR産物を解析した。

さらにERBB3-蛋白質の過剰産生について検討するため、培養細胞の膜画分をニトロセルロース膜に吸着させてから、Kawamotoらの方法で

抗c-erbB-3抗体を一次抗体としたdot blottingを行った。

2) ヌードマウスに移植した培養細胞の原発巣、転移巣における
c-erbB-2, c-erbB-3および分泌型 *erbB-3* の発現

ヒト扁平上皮癌培養細胞をBALB/c ヌードマウスの舌に移植し、舌に定着し増殖した腫瘍組織と頸部リンパ節に転移した腫瘍組織を摘出し、1)と同様な方法によりc-erbB-2, c-erbB-3遺伝子の増幅、c-erbB-2および膜型、分泌型の *erbB-3* mRNA発現の定量的解析を行い発現量の変化を解析した。また転移巣の一部を舌に継代し再び頸部リンパ節に転移した腫瘍組織を摘出し同様の解析を行った。なお、この継代を3代行った。

3) 臨床組織におけるERBB-3蛋白質の過剰産生と臨床・病理組織学的悪性度との関係

第二口腔外科受診患者のうち臨床・病理組織学的検索が十分に行えたものについて、手術摘出材料から組織切片を作製し、ヒト抗c-erbB-3抗体を用いSAB法にて免疫染色を行った。そしてERBB-3蛋白質が過剰産生している組織と腫瘍進展度、腫瘍浸潤様式などの臨床・組織学的悪性度や予後についての関係を検討した。統計処理は χ^2 検定を用いた。なお生存率はKaplan-Meier法を用いて検討した。

【結果】

1) ヒト扁平上皮癌細胞においてc-erbB-3遺伝子genomic DNAの増幅は認められなかったが、膜型および分泌型の *erbB-3* mRNAの過剰発現を認めた。また膜型のc-erbB-3を認識する抗体を用いたdot blottingでは、膜型c-erbB-3 mRNAの過剰発現に相当したERBB-3蛋白質の過剰産生が認められた。

2) ヌードマウスに移植した扁平上皮癌では原発巣に比べて転移巣のほうがc-erbB-2および膜型c-erbB-3 mRNAの発現量が増加し、反対に分泌型 *erbB-3* mRNAの発現量は低下した。また転移巣においても原発巣と同様c-erbB-2およびc-erbB-3遺伝子genomic DNAの増幅は認められなかった。

3) 臨床材料においてERBB-3蛋白質が過剰産生している組織は浸潤度・転移度が高く5年生存率も有意に低下していた。

【考察および結論】

c-erbBおよびc-erbB-2については癌細胞において遺伝子増幅に加えて遺伝子産物の過剰発現が報告されているが、本研究よりc-erbB-3については扁平上皮癌において遺伝子増幅が認められず、遺伝子産物の過剰発現が認められたことから、c-erbB-3遺伝子産物の過剰発現が転写レベルで生じていることが考えられた。また腺癌においてもc-erbB-3は遺伝子増幅がなく遺伝子産物の過剰発現が報告されていることから、c-erbB-3が腺癌と扁平上皮癌に共通に関与していると思われる。さらに扁平上皮癌では、過剰発現した症例は、浸潤度・転移度が高く、予後不良であり、従ってc-erbB-3遺伝子産物は口腔領域扁平上皮癌において、高悪性型の腫瘍マーカーとなることが示唆された。

論文審査結果の要旨

本研究はヒト扁平上皮癌株化細胞およびヒト口腔扁平上皮癌（臨床材料）における *erbB* 関連遺伝子とその遺伝子産物について検討したものである。扁平上皮癌株化細胞では *c-erbB-2* 遺伝子の増幅および mRNA の過剰発現は認められず、*c-erbB-3* は遺伝子の増幅は認められなかったが mRNA および遺伝子産物の発現量の増加を認めた。ヒト口腔扁平上皮癌では *c-erbB-3* 遺伝子の増幅は認められないが、遺伝子産物は過剰発現していた。このことは、*c-erbB-3* 遺伝子産物は転写レベルで生じていることを示唆している。ヌードマウスの舌に移植した扁平上皮癌株化細胞は、原発巣より転移巣において *c-erbB-2* および *c-erbB-3* 遺伝子産物の発現量が増加し、原発巣と転移巣では様相が異なる。ヒト口腔扁平上皮癌の免疫組織学的検索と臨床態度の分析結果から、*c-erbB-3* 蛋白質の過剰発現している症例は、リンパ節転移の頻度が高く、び慢性浸潤様式のものが多く、また予後不良であることが統計的有意差をもって明かとなった。

本研究は、*erbB* 関連遺伝子と扁平上皮癌との関与の一部を解明するとともに、口腔扁平上皮癌の治療指針あるいは予後判定の補助となる点で臨床的にも有意義な業績であり、本研究者は博士（歯学）の学位を得る資格があると認める。